



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, C12P 19/34	A1	(11) 国際公開番号 WO96/14434 (43) 国際公開日 1996年5月17日(17.05.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/02254 (22) 国際出願日 1995年11月6日(06.11.95) (30) 優先権データ 特願平6/272044 1994年11月7日(07.11.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 理化学研究所(THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH)[JP/JP] 〒351-01 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 林崎良英(HAYASHIZAKI, Yoshihide)[JP/JP] 佐々木宣哉(SASAKI, Nobuya)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市高野台三丁目1-1 理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター内 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 塩澤寿夫, 外(SHIOZAWA, Hisao et al.) 〒103 東京都中央区八重洲一丁目8番12号 藤和八重洲一丁目ビル7階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : METHOD OF DNA SEQUENCING (54) 発明の名称 DNAの塩基配列決定方法 (57) Abstract A method of DNA sequencing for determining the base sequence of a DNA product amplified by the polymerase chain reaction without removing a primer and/or 2'-deoxyribonucleoside 5'-triphosphate and/or a derivative thereof, which method comprises preparing a nucleic acid transcription product by the reaction of ribonucleoside 5'-triphosphates comprising ATP, GTP, CTP, UTP or derivatives thereof with one or more 3'-deoxyribonucleotide 5'-triphosphates comprising 3'-dATP, 3'-dGTP, 3'-dCTP, 3'-dUTP and derivatives thereof in the presence of an RNA polymerase and the abovementioned amplified DNA product containing the promoter sequence for the RNA polymerase, separating the transcription product thus prepared, and reading the sequence of the nucleic acids in the separated fraction.		

(57) 要約

ポリメラーゼ連鎖反応により増幅したDNA生成物の塩基配列を、プライマー及び／又は2' デオキシリボヌクレオシド5' トリフォスフェート及び／又はその誘導体を除去することなく決定する方法であって、RNAポリメラーゼ及び前記RNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含む前記ポリメラーゼ連鎖反応により増幅したDNA生成物の存在下、 ATP、GTP、CTP及びUTP又はそれらの誘導体からなるリボヌクレオシド5' トリフォスフェート類並びに3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP及びそれらの誘導体からなる1種又は2種以上の3' デオキシリボヌクレオチド5' トリフォスフェートを反応させて核酸転写生成物を得、得られる核酸転写生成物を分離し、得られる分離分画から核酸の配列を読み取るDNAの塩基配列決定方法が提供される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	DE	ドイツ	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	EE	エストニア	LS	レソト	RU	ロシア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LT	リトアニア	SD	スーダン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	MC	モナコ	SI	スロベニア
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SK	スロバキア
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MK	マケドニア	SS	ス威士チ
CA	カナダ	IE	アイルランド	ML	マリナ	TD	トニ
CC	中東	IS	イスラエル	MN	モンゴル	TG	タンザニア
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード
CI	コート・ジボワール	KR	韓国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KZ	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	LI	リヒテンシュタイン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CO	コロンビア			NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CU	キューバ			PL	ポーランド		

明細書

DNAの塩基配列決定方法

技術分野

本発明は、DNAの塩基配列決定法に関する。さらに詳しくは、PCR法を利用した、ダイレクト・トランスクリプトシーケンシング法によるDNAの塩基配列決定方法に関する。

背景技術

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法は優れた方法であり、年々その利用範囲が広がっている〔Randall K. Saiki et al. (1988) Science 239, 487-491〕。PCR法では、1分子のDNA断片を増幅することもできる。PCR法で増幅した生成物をシーケンスする方法（ダイレクト・シーケンス法）も有用な手法である〔Corinne Wong et al. (1988) Nature, 330, 384-386〕。この方法はライブラリー作製やそのスクリーニングなしに多くのサンプルの配列情報を同時に得られる迅速な方法である。

しかるに、上記ダイレクト・シーケンス法には2つの大きな問題点がある。

1つは、取り込まれなかったプライマー及び2' デオキシリボヌクレオシド5' トリフォスフェート（2' dNTPs）が反応系中に残存し、これらがシーケンス反応を妨げることである。従って、従来法では、これら残存するプライマーと2' dNTPsは、シーケンシングの前にPCR生成物から除去する必要があった。PCR生成物の精製方法には種々の方法があり、例えば、電気泳動による精製法、エタノール沈殿法、濾過法、HPLC精製法がある〔例えば、Dorit R.L. et al. (1991) Current Protocols in Molecular Biology, Vol.11, John Wiley and Sons, New York, 15.2.1-15.2.11参照〕。しかし、いずれの方法も煩雑である。

2つ目の問題は、PCR生成物の迅速な再生（renaturation）である。PCR生成物が2本鎖DNAに再生してしまうと、1本鎖のテンプレート（鋳型）ではなくなり、プライマーと1本鎖テンプレート（鋳型）との間のアニーリングを妨

げる。再生を最小限にするための方法として、例えば変性後の急冷、1つのプライマーのビオチレーション (biotilation) とストレプトアビジン被覆物へのPCR生成物の吸着、エキソヌクレアーゼの使用、非対象PCR等が報告されている〔例えば、Barbara Bachmann et al. (1990) Nucleic Acid Res. Vol.18, 1309 参照〕。しかし、これらの方法の殆どは、長い時間を必要とし、面倒である。

そこで本発明の目的は、PCR反応系中に残存する未反応のプライマー及び2'デオキシリボヌクレオシド5'トリフォスフェート (2' dNTPs) を除去することなく、かつPCR生成物が迅速に再生する問題を回避する為、変性自体を全く行わないで良い、全く新しいDNAの塩基配列決定方法を提供することにある。

発明の開示

本発明は、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅したDNA生成物の塩基配列を、プライマー及び／又は2'デオキシリボヌクレオシド5'トリフォスフェート及び／又はその誘導体を除去することなく決定する方法であって、

RNAポリメラーゼ及び前記RNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含む前記ポリメラーゼ連鎖反応により増幅したDNA生成物の存在下、

ATP、GTP、CTP及びUTP又はそれらの誘導体からなるリボヌクレオシド5'トリフォスフェート類並びに3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP及びそれらの誘導体からなる1種又は2種以上の3'デオキシリボヌクレオチド5'トリフォスフェート (3' dNTP誘導体) を反応させて核酸転写生成物を得、得られる核酸転写生成物を分離し、得られる分離分画から核酸の配列を読み取ることを特徴とするDNAの塩基配列決定方法に関する。

本発明は、前記ダイレクト・シーケンス法にある問題を解決したものであり、T7 RNAポリメラーゼ等のRNAポリメラーゼ等とRNA転写反応のターミネーター (例えば、3'デオキシリボヌクレオシド5'トリフォスフェート (3' dNTPs)) を用いたダイレクト・トランスクリプトシーケンス法に関する。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1において得られたダイレクト・トランスクリプトシーケン

ス法によるオートラジオグラフィーの結果を示す電気泳動写真である。

図 2 は、実施例 2 において得られた蛍光ダイレクト・トランスクリプトシーケンシング法によるエレクトロフェログラムの結果を示す。

本発明を実施するための最良の形態

本発明は、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅した DNA 生成物の塩基配列を、ポリメラーゼ連鎖反応のためのプライマー及び／又は 2' デオキシリボヌクレオシド 5' トリフォスフェート及び／又はその誘導体を除去することなく決定する方法である。

ここで用いる DNA ポリメラーゼ連鎖反応は、PCR 法として広く用いられている方法をそのまま用いることができる。従って、増幅の対象である DNA 配列、プライマー、増幅のための条件等には特に制限はない。

例えば、反応系として、10～50 ng のゲノミック DNA 又は 1 pg のクローニングされた DNA、10 μ M の各プライマー、200 μ M の各 2' デオキシリボヌクレオシド 5' トリフォスフェート (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) を含む 20 μ l 容量中で DNA ポリメラーゼとして、例えば Taq ポリメラーゼ等を用いて行うことができる。

但し、ポリメラーゼ連鎖反応のためのプライマーのいずれか一方又は増幅された挿入(insert)DNA が、後述する RNA ポリメラーゼのためのプロモーター配列を含む必要がある。

RNA ポリメラーゼのためのプロモーター配列は、用いる RNA ポリメラーゼにより適宜選択することができる。

本発明の方法では、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅した DNA 生成物から RNA 転写物等の核酸転写物を合成する。前記のように、増幅して得られた DNA 生成物は、RNA ポリメラーゼのためのプロモーター配列を含む。従って、このプロモーター配列が RNA 転写物等の核酸転写物の合成の際に、RNA ポリメラーゼを起動させる。

RNA 転写物等の核酸転写物の合成に用いられる RNA ポリメラーゼとしては、例えばバクテリオファージ RNA ポリメラーゼ (T7、T3 及び SP6 等) を挙

げることができる。バクテリオファージRNAポリメラーゼは、クローン化されたDNAテンプレートからRNA転写物のin vitroでの合成に広く用いられている。これらのファージRNAポリメラーゼは、それらのプロモーターから下流にDNA配列を特異的に転写する (P.A. Krieg et al. (1987) *Methods in Enzymology* 155, 397-415)。

RNA転写物等の核酸転写物の合成は、前記RNAポリメラーゼの存在下、ATP、GTP、CTP及びUTP又はこれらの誘導体からなるリボヌクレオシド5'トリフォスフェート (NTP) 類、並びに1種又は2種以上の3' dNTP誘導体を反応させる。尚、3' dNTP誘導体は、本明細書においては、3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP及びこれらの誘導体の総称として用いる。リボヌクレオシド5'トリフォスフェート (NTP) 類としては、その一部がATP等の誘導体である場合も含めて、塩基が異なる少なくとも4種類の化合物が転写物の合成に必要である。但し、同じ塩基を含む2種以上の化合物を用いることはできる。

転写生成物であるRNA又は核酸の3'末端には、3' dNTP誘導体を取り込まれることにより、3'ヒドロキシ基が欠落し、RNA又は核酸の合成が阻害される。その結果、3'末端が3' dNTP誘導体である種々の長さのRNA又は核酸断片が得られる。塩基の異なる4種類の3' dNTP誘導体について、それぞれ、このようなりボヌクレオシド・アナログ体を得る。このリボヌクレオシド・アナログ体を4通り用意することで、RNA又は核酸配列の決定に用いることができる

(Vladimir D. Axelred et al. (1985) *Biochemistry* Vol. 24, 5716-5723)。

尚、3' dNTP誘導体は、1つの核酸転写反応に1種類又は2種以上を用いることができる。1種のみの3' dNTP誘導体を用いて1つの核酸転写反応を行う場合、核酸転写反応を4回行うことで、3'末端の3' dNTP誘導体の塩基の異なる4通りの転写生成物を得る。1回の核酸転写反応で、3'末端の3' dNTP誘導体は同一で、分子量の異なる種々のRNA又は核酸断片の混合物である転写生成物が得られる。得られた4通りの転写生成物について、独立に、後述する分離及び配列の読み取りに供することができる。また、4通りの転写生成物の2種以上を混合し、この混合物を分離及び配列の読み取りに供することもできる。

1回の核酸転写反応に2種以上の3' dNTP誘導体を同時に用いると、1つの反応生成物中に、3'末端の3' dNTP誘導体の塩基の異なる2通り以上の転写生成物が含まれることになる。これを後述する分離及び配列の読み取りに供することができる。核酸転写反応に2種以上の3' dNTP誘導体を同時に用いると、核酸転写反応操作の回数を減らすことができるので好ましい。

以上のように、本発明のダイレクト・トランスクリプトシーケンス法では、PCR法において、2種類のプライマーのいずれか一方にファージプロモーター配列を持っているプライマーを用いるか、又は増幅された挿入DNA内にファージプロモーター配列を持たせることで、得られるPCR生成物はそのプロモーターにより働くRNAポリメラーゼを用いるin vitro転写に付すことができる。

さらに、RNA等の核酸転写が、塩基の異なる4種類のリボヌクレオシド5'トリフォスフェート類の存在下で、RNAポリメラーゼにより行われ、かつ3' dNTP誘導体によりターミネートされる。その結果、各塩基について、RNA又は核酸ラダー（ladder）がシーケンスのために生成される。

本発明の方法では、RNA又は核酸転写生成物を分離する。この分離は、転写生成物に含まれる分子量の異なる複数の生成物分子を、分子量に応じて分離することができる方法で適宜行うことができる。このような分離方法としては、例えば電気泳動法を挙げることができる。その他にHPLC等も用いることができる。

電気泳動法の条件等には特に制限はなく、常法により行うことができる。転写生成物を電気泳動法に付することにより得られるバンド（RNA又は核酸ラダー）からRNA又は核酸の配列を読み取ることができる。

RNA又は核酸ラダーの読み取りは、転写物反応に用いるリボヌクレオシド5'トリフォスフェート（NTP）類を標識することにより行うことができる。また、RNA又は核酸ラダーの読み取りは、転写物反応に用いる3' dNTP誘導体を標識することにより行うこともできる。標識としては、例えば、放射性若しくは安定同位元素又は蛍光標識等を挙げることができる。放射性若しくは安定同位元素で標識された3' dNTP誘導体は市販品として入手可能である（例えば、3' dATP（CORDYCEPIN 5'-TRIPHOSPHINE）は、SIGMA, ST. LOUIS, MO, USAからProduct No. C9137 として、BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim, GermanyからProduct No. 81428

8 として入手可能である。 α - ^{32}P -3' dATP (3'-[α - ^{32}P]-CORDYCEPIN 5'-TRIPHOSPHINE) は、DU PONT/NEN Research Products, MA, USA からProduct No.NEG-026 として入手可能である。) また、蛍光標識された3' dNTP誘導体は、特開昭63-152364号、特開平7-5170号、特表平5-502371号等に記載の方法を参照して製造することにより入手可能である。

具体的には、例えば、標識された3' dNTP誘導体、より具体的には、標識された3' dATP、3' dGTP、3' dCTP及び3' dUTPを用い、転写生成物を電気泳動に付して得られるバンドの放射性若しくは安定同位元素又は蛍光を検出することで、転写生成物の配列を読み取ることができる。このように3' dNTP誘導体を標識することで、各バンド間の放射性強度又は蛍光強度にばらつきがなく、測定が容易になる。さらに放射性若しくは安定同位元素又は蛍光を発生するラダーの検出は、例えば、これまでDNAシーケンシングに用いている装置を適宜用いて行うことができる。

また、放射性若しくは安定同位元素又は蛍光標識されたATP、GTP、CTP及びUTPを用い、電気泳動に付して得られるバンドの放射性若しくは安定同位元素又は蛍光を検出することでも転写生成物の配列を読み取ることができる。

さらに、異なる蛍光で標識された3' dATP、3' dGTP、3' dCTP及び3' dUTPを用い、末端が3' dATP、3' dGTP、3' dCTP又は3' dUTPであり、異なる標識がなされた種々の転写生成物断片の混合物を電気泳動に付して得られるバンドの4種類の蛍光を検出することでRNA又は核酸の配列を読み取ることにもできる。

この方法では、4種類の3' dNTPをそれぞれ異なる蛍光で標識する。このようにして3' 末端の異なる4種類の転写生成物の混合物を電気泳動に付することで、4種類の異なる(3' 末端の3' dNTP) 応じた蛍光を発するバンドが得られ、この蛍光の違いを識別しながら、1度に4種類のRNA又は核酸の配列を読み取ることができる。

上記のように読み取られたRNA又は核酸配列から、転写の鋳型として用いられたDNAの配列を決定することができる。各塩基について、それぞれラダーを形成した場合には、4種類のラダーから得られたRNA又は核酸配列情報を総合

して、転写の鋳型として用いられたDNAの配列を決定することができる。また、2種以上の塩基について同時にラダーを形成した場合（同一のラダー内に2種以上の塩基のバンドが共存する場合）には、各ラダーから得られたRNA又は核酸配列情報を総合して、転写の鋳型として用いられたDNAの配列を決定することができる。特に、4種の塩基について同時にラダーを形成した場合（同一のラダー内に4種の塩基のバンドが共存する場合）には、1つのラダーから得られたRNA又は核酸配列情報から、転写の鋳型として用いられたDNAの配列を決定することができる。

本発明の方法によれば、PCR生成物を精製することなく、そのままPCR生成物のDNAの塩基配列を決定することができる。

この利点は、反応混合物に残存する2' dNTPが、シーケンシングのための3' dNTPの存在下ではRNA転写反応において試薬として消費されることがないという、RNAポリメラーゼの特徴によるものである。

さらに、本発明の方法では、RNAの転写反応を利用するため、通常のDNAシーケンス法のように1本鎖テンプレートDNAを使用する必要も、プライマーも必要がなく、さらにシーケンシングプライマーのハイブリダイズのための変性工程も必要としない。そのため、PCR生成物の再生の影響も受けず、容易にDNAの塩基配列を決定することができる。

以下本発明を実施例によりさらに説明する。

実施例1

PCR反応

PCR反応のテンプレートには、ブルースクリプトIIベクターに結合したヒトTSHβ鎖断片を用いた。このDNA断片1pg、10μMの各プライマー〔T7プライマーとM13リバースプライマー〕、200μMの各2'デオキシリボヌクレオシド5'トリフォスフェート（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）を含む20μl容量中で行った。この系にTaqポリメラーゼ緩衝液〔50mM KCl、10mM Tris・HCl（pH8.3）、1～3mM MgCl₂、0.01%ゼラチン〕と0.5ユニットのTaqポリメラーゼを添加した。

第1のサイクルは95℃(変性)で5分間、55～60℃(アニーリング)で1分間、72℃(エクステンション)で2分間とした。このサイクルに次いで、95℃で1分間、55～60℃で1分間、72℃で2分間のサイクルを25～30回おこなった。最後のエクステンションの工程は10分間に延長した。

シーケンシング反応

上記PCR反応物の1～5μlを、10～50μMの3'デオキシリボヌクレオチド5'トリフォスフェートの1つである3' dATPの1つ、100μMの各リボヌクレオチド5'トリフォスフェート(ATP、GTP、CTP、UTP)、0.5μlのα-³²P-UTP(3000Ci/mmol、10mCi/ml)

(Amersham, Buckinghamshire, UK)、40mM Tris・HCl(pH7.5)、5～10mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、1～5ユニットのT7 RNAポリメラーゼを含むサンプリングチューブに添加し、全体量を10μlとした。

3'デオキシリボヌクレオチド5'トリフォスフェートが3' dCTP、3' dGTP又は3' dUTPの場合も同様に行った。

得られたサンプルは、37℃で30分インキュベートした。次いで、各反応物は3μlのホルムアミドダイ(95%ホルムアミド、10mM EDTA、0.05%ブROMフェノールブルー及び0.05%キシレンシアノール)と混合し、80℃で5分間加熱し、即座に、6%シーケンスゲルにアプライし、レーンに充填した。電気泳動を30Wの定電力で2時間行った。ゲルは濾紙上で乾燥し、BAS2000イメージアナライザー(FUJI)にて解析をおこなった。

その結果、図1に示すように、シーケンスラダーが前記のプロトコールにより生成した。

実施例2

実施例1と同様にしてPCR反応を行い、PCR反応生成物を得、このPCR反応生成物について以下のシーケンシングを行なった。

上記PCR反応物の1～5μlを、10～50μMの蛍光物質(テトラメチルローダミン)で標識した3'デオキシリボヌクレオチド5'トリフォスフェートの1

つである3' dUTPの1つ、100 μ Mの各リボヌクレオシド5' トリフォスフェート(ATP、CTP、GTP、UTP)、40mM Tris·HCl (pH 7.5)、5~10mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、1~5ユニットのT7RNAポリメラーゼを含むサンプリングチューブに添加し、全体量を10 μ lとした。尚、テトラメチルローダミンで標識した3' デオキシリボヌクレオチド5' トリフォスフェートは後述の参考例に示す方法により合成した。

得られたサンプルは、37°Cで30分インキュベートした。次いで、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿等により過剰な蛍光標識3' dUTPを除去し、沈殿物を3 μ lのホルムアミドダイ(95%ホルムアミド、10mM EDTA)に溶解し、80°Cで5分間加熱し、即座に、4%シークエンスゲルにアプライし、ABI 377 蛍光自動シークエンサーによる泳動を7時間行った。その結果、図2に示すように、Uのエレクトロフェログラムが前記のプロトコールにより生成した。

蛍光標識3' デオキシリボヌクレオチド5' トリフォスフェートが3' dCTP、3' dGTP又は3' dATPの場合も同様に行うことができる。

参考例

TMR (テトラメチルローダミン) 標識3' - デオキシウリジン-5' -トリホスフェートの調製

1) 3' - デオキシ-5' -0-ジメトキシトリチルウリジン (3'-Deoxy-5'-0-dimethoxytrityluridine) の合成

3' - デオキシウリジン (4 g)、トリエチルアミン (2.46 ml)、N,N'-ジメチルアミノピリジン (0.76 g) をピリジン (100 ml) に溶解し、4'-ジメトキシトリフェニルメチルクロリド (13.13 g) の塩化メチレン (70 ml) 溶液を加えた後室温で25時間反応させた。反応終了後、反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を酢酸エチルで抽出し、抽出液を飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去しシリカゲルカラムクロマトグラフィ (溶出液: 酢酸エチル-n-ヘキサン混合溶媒) で精製して3' - デオキシ-5' -0-ジメトキシトリチルウリジン 9.04 gを得た (収率97.5%)。

2%)。

2) 2'-O- アセチル-3'-デオキシ-5'-O-ジメトキシトリチルウリジン (2'-O-Acetyl-3'-deoxy-5'-O-dimethoxytrityluridine) の合成

3'-デオキシ-5'-O-ジメトキシトリチルウリジン (9.02 g) をピリジン (100 ml) に溶解し、氷冷下無水酢酸 (30 ml) を加え以後室温で一液反応させた。反応終了後、反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を酢酸エチルで抽出し、抽出液を飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去しシリカゲルカラムクロマトグラフィ (溶出液: 酢酸エチル-n-ヘキサン混合溶媒) で精製して2'-O- アセチル-3'-デオキシ-5'-O-ジメトキシトリチルウリジン 7.12 g を得た (収率 73.2%)。

3) 2'-O- アセチル-3'-デオキシウリジン (2'-O-Acetyl-3'-deoxyuridine) の合成

2'-O- アセチル-3'-デオキシ-5'-O-ジメトキシトリチルウリジン (7.12 g) を80%酢酸に溶解し室温で一液反応させた。反応終了後、反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (溶出液: 酢酸エチル-メタノール混合溶媒) で精製し、酢酸エチル-n-ヘキサンより結晶化して2'-O-アセチル-3'-デオキシウリジン 2.58 g を得た (収率 76.8%)。

融点: 148~149°C

¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 1.92-2.01(m, 1H, 3'-Ha), 2.06(s, 3H, CH₃CO), 2.17-2.23(m, 1H, 3'-Hb), 3.35(brs, 1H, 5'-OH), 3.52, 3.71(2dd, 2H, J=3.2, 12.2; 2.7, 11.9, 5'-Ha, b), 4.20-4.30(m, 1H, 4'-H), 5.22-5.26(m, 1H, 2'-H), 5.61(dd, 1H, J=2.2, 8.1Hz, 5-H), 5.78(d, 1H, J=2.7Hz, 1'-H), 7.91(d, 1H, J=8.1Hz, 6-H), 11.32(brs, 1H, NH)

4) 2'-O- アセチル-3'-デオキシ-5-ヨードウリジン (2'-O-Acetyl-3'-deoxy-5-iodouridine) の合成

2'-O- アセチル-3'-デオキシウリジン (2.47 g) のアセトニトリル (150 ml) 溶液に硝酸二アンモニウムセリウム (IV) (2.51 g) とよう素 (1.39 g) を添加し80°Cで1時間反応させた。反応終了後、反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を酢酸エチルで抽出し5%亜硫酸水素ナトリウム水と飽和食塩水で

洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去して2'-0-アセチル-3'-デオキシ-5-ヨードウリジン 3.37 gを得た(収率93.1%)。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) δ ppm: 2.01-2.07(m, 1H, 3'-Ha), 2.12(s, 1H, CH_3CO), 2.45-2.49(m, 1H, 3'-Hb), 3.48-3.50(m, 1H, 5'-OH), 3.75, 4.09(2dd, 2H, $J=2.7, 12.7; 2.0, 12.4\text{Hz}$, 5'-Hab), 4.40-4.50(m, 1H, 2'-H), 5.79(d, 1H, $J=1.9\text{Hz}$, 1'-H), 8.28(s, 1H, 6-H), 9.50(brs, 1H, NH)

5) 2'-0-アセチル-3'-デオキシ-5-(3"-トリフルオロアセタミド-1"-プロピニル)ウリジン (2'-0-Acetyl-3'-deoxy-5-(3"-trifluoroacetamido-1"-propynyl) uridine)の合成

2'-0-アセチル-3'-デオキシ-5-ヨードウリジン (1.0 g) のDMF (12.6 ml) 溶液に窒素気流下、N-プロパギルトリフルオロアセタミド (0.88 ml)、よう化銅(I) (96 mg)、塩化ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II) (177 mg) 及びトリエチルアミン (0.7 ml) を加え室温で4時間反応させた。反応液を減圧濃縮して得た残渣を塩化メチレン-メタノール混液 (40 ml) に溶解しイオン交換樹脂AG1x8 (Bio-Rad社製、 HCO_3^- 型; 2 g) を加え30分間攪拌した。濾別後、濾液を濃縮し得られた残渣を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去しシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出液: 酢酸エチル-n-ヘキサン混合溶液)で精製して2'-0-アセチル-3'-デオキシ-5-(3"-トリフルオロアセタミド-1"-プロピニル)ウリジン 405 mgを得た(収率38.3%)。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 1.89-1.92(m, 1H, 3'-Ha), 2.06(s, 3H, CH_3CO), 2.17-2.26(m, 1H, 3'-Hb), 3.40(brs, 1H, 5'-OH), 3.53, 3.76(2dd, 2H, $J=3.1, 11.9; 2.7, 12.1\text{Hz}$, 5'-Hab), 4.22-4.30(m, 3H, 4'-H, $-\text{CH}_2-$), 5.28-5.31(m, 1H, 2'-H), 5.75(d, 1H, $J=1.9\text{Hz}$, 1'-H), 8.34(s, 1H, 6-H), 10.06(t, 1H, $J=5.4\text{Hz}$, NHCOCF_3), 11.67(s, 1H, NH)

6) 5-(3"-アミノ-1"-プロピニル)-3'-デオキシウリジン-5'-トリホスフェート [5-(3"-Amino-1"-propynyl)-3'-deoxyuridine-5'-triphosphate]の合成

2'-0- アセチル-3'-デオキシ-5-(3"-トリフルオロアセタミド-1"-プロピニル) ウリジン (42 mg) を無水ピリジン (2 ml) に溶解した後減圧濃縮乾固し更に1時間デシケーター (P₂O₅) で乾燥した。窒素気流下に無水ピリジン (100 μ l) と無水ジオキサン (300 μ l) に溶解し1M-2-クロロ-4H-1,3,2-ベンゾジオキサフォスフォリン-4-オンのジオキサン溶液 (110 μ l) を加え10分間攪拌した。反応液に0.5M-ビス(トリ-n-ブチルアンモニウム) ピロフォスフェートのDMF溶液 (300 μ l) とトリ-n-ブチルアンモニウム (100 μ l) を加え10分間攪拌した。次いで1%よう素のピリジン-水 (98/2, v/v) 溶液を加え更に15分間攪拌した。反応終了後5%亜硫酸水素ナトリウム水を添加し反応液を減圧濃縮した。得られた残渣に水 (10 ml) を加え30分間放置後、25%アンモニア水 (20 ml) を加え2時間攪拌した。反応液を濃縮乾固して得た残渣をDEAE-トヨパールイオン交換カラムクロマトグラフィー (東ソー社製; 1.2 x 30 cm; 溶出液: トリエチルアンモニウムカーボネート緩衝液 (pH7.5) 0.05M \rightarrow 0.5M直線濃度勾配 (全量2L)) で精製して5-(3"-アミノ-1"-プロピニル)-3'-デオキシウリジン-5'-トリホスフェート 51 mgを得た (収率55%)。

7) TMR-標識3'-デオキシウリジン-5'-トリホスフェート (TMR-labeled 3'-deoxyuridine-5'-triphosphate) の合成

5-(3"-アミノ-1"-プロピニル)-3'-デオキシウリジン-5'-トリホスフェート (10.5 μ mol) の1Mトリエチルアンモニウムカーボネート緩衝液 (pH9.05; 1.2 ml) に5-カルボキシテトラメチルローダミンコハク酸イミドエステル (モレキュラーブロー社製) (15 mg) のDMF溶液 (0.9 ml) を加え室温で一液攪拌した。反応液に水 (30 ml) を加え希釈した後、DEAE-トヨパールイオン交換カラムクロマトグラフィー (1.2 x 30 cm; 溶出液: トリエチルアンモニウムカーボネート緩衝液 (pH7.5) 0.05M \rightarrow 0.7M直線濃度勾配 (全量2L)) で精製してTMR-標識3'-デオキシウリジン-5'-トリホスフェート 7.38 μ mol を得た (収率70.2%)。

請求の範囲

(1) ポリメラーゼ連鎖反応により増幅したDNA生成物の塩基配列を、プライマー及び／又は2' デオキシリボヌクレオシド5' トリフォスフェート及び／又はその誘導体を除去することなく決定する方法であって、

RNAポリメラーゼ及び前記RNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含む前記ポリメラーゼ連鎖反応により増幅したDNA生成物の存在下、

ATP、GTP、CTP及びUTP又はそれらの誘導体からなるリボヌクレオシド5' トリフォスフェート類並びに3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP及びそれらの誘導体からなる1種又は2種以上の3' デオキシリボヌクレオチド5' トリフォスフェート（以下、3' dNTP誘導体という）を反応させて核酸転写生成物を得、得られる核酸転写生成物を分離し、得られる分離分画から核酸の配列を読み取ることの特徴とするDNAの塩基配列決定方法。

(2) リボヌクレオシド5' トリフォスフェート類としてATP、GTP、CTP及びUTPを用いる請求項1記載の方法。

(3) 3' デオキシリボヌクレオチド5' トリフォスフェートとして3' dATP、3' dGTP、3' dCTP及び3' dUTPを用いる請求項1記載の方法。

(4) 核酸転写反応は、異なる塩基を含む4種の3' dNTP誘導体について、4回独立に行い、3' 末端が異なる塩基である4通りの核酸転写生成物を得る、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

(5) 3' 末端が異なる塩基である4通りの核酸転写生成物を、それぞれ独立に分離するか、又は少なくとも2通りの核酸転写生成物を混合した後に、分離する、請求項4記載の方法。

(6) 少なくとも1つの核酸転写反応は、異なる塩基を含む4種の3' dNTP誘導

体の内の2種以上の存在下で行い、3'末端が異なる塩基である2通り以上の核酸転写生成物を同時に混合状態で得る、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

(7) 核酸転写反応は、異なる塩基を含む4種の3' dNTP誘導体の存在下で1回を行い、3'末端が異なる塩基である4通りの核酸転写生成物を同時に混合状態で得る、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

(8) 核酸転写生成物の分離を電気泳動法により行う請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

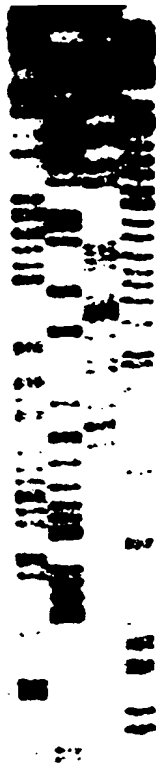
(9) リボヌクレオシド5'トリフォスフェート類が標識されており、分離分画からの核酸の配列の読み取りを、標識からのシグナルを検出することにより行う請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

(10) 3' dNTP誘導体が標識され、分離分画からの核酸の配列の読み取りを、標識からのシグナルを検出することにより行う請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

(11) 標識が放射性若しくは安定同位元素又は蛍光標識である請求項9又は10に記載の方法。

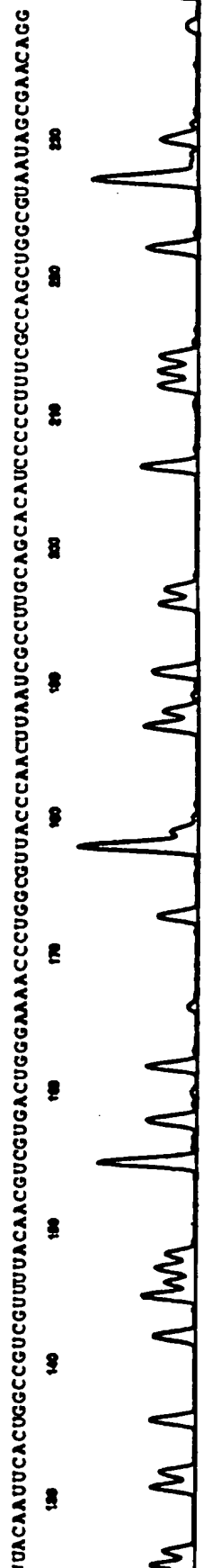
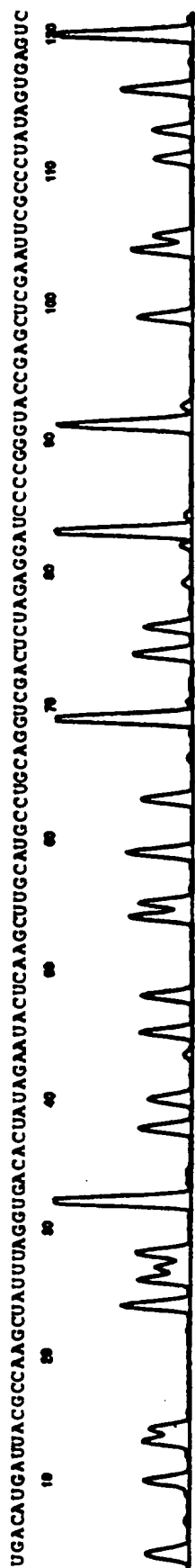
☒ 1

A C G U





2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02254

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12Q1/68, C12P19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12Q1/68, G01N33/50, C12P19/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, CAS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DNA Vol. 5, No. 2, 1986(86) J. Parvin "Rapid RNA Sequencing using Double-Stranded Template DNA, SP6 Polymerase, and 3'-Deoxynucleotide Triphosphates" p. 167-171	1 - 11
Y	Biochemistry Vol. 24, No. 21, 1985(85) V. D. Axelrod "Transcription from Bacteriophage T7 and SP6 RNA Polymerase Promoters in the Presence of 3'-Deoxyribonucleoside 5'-Triphosphate Chain Terminators" p. 5716-5723	1 - 11
Y	Gene Anal. Tech. Vol. 3, No. 4, 1986(86) J. F. Klement "Sequencing of DNA Using T3 RNA Polymerase and Chain Terminating Ribonucleotide Analogues" p. 59-66	1 - 11
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 75, No. 11 1978(78) Kramer "RNA Sequencing with radioactive chain-terminating ribonucleotides" p. 5334-5338	1 - 11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
January 18, 1996 (18. 01. 96)

Date of mailing of the international search report
February 6, 1996 (06. 02. 96)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02254

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Science Vol. 239, January 29, 1988 (29. 01. 88) S. S. Sommer "Genomic Amplification with Transcript Sequencing" p. 491-494	1 - 11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁸ C12Q1/68, C12P19/34		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁸ C12Q1/68, G01N33/50, C12P19/34		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L, CAS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	DNA 第5巻2号 1986(86) J. Parvin 「Rapid RNA Sequencing Using Double- Stranded Template DNA, SP6 Polymerase, and 3'-Deoxynucleotide Triphosphates」 p.167-171	1-11
Y	Biochemistry 第24巻21号 1985(85) V. D. Axelrod「Transcription from Bacteriophage T7 and SP6 RNA Polymerase	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 18.01.96		国際調査報告の発送日 06.02.96
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 種 村 慈 電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Promoters in the Presence of 3'-Deoxyribonucleoside 5'-Triphosphate Chain Terminators」 p.5716-5723	
Y	Gene Anal. Tech. 第3巻4号, 1986(86) J. F. Klement 「Sequencing of DNA Using T3 RNA Polymerase and Chain Terminating Ribonucleotide Analogs」 p.59-66	1-11
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 第75巻11号 1978(78) Kramer「RNA Sequencing with radioactive chain-terminating ribonucleotides」 p.5334-5338	1-11
Y	Science 第239巻 29. 1月. 1988(29. 01. 88) S. S. Sommer 「Genomic Amplification with Transcript Sequencing」 p.491-494	1-11